



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 130 069⁽¹³⁾ C1
(51) МПК⁶ C 12 N 7/00, 7/02, 11/02, A 61
K 39/44

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97103958/13, 14.03.1997

(46) Дата публикации: 10.05.1999

(56) Ссылки: RU 2057804 C1, 22.12.93. RU 2016897 C1, 12.09.91. RU 2051173, 09.01.92. РСТ 8908701 A1, 21.09.89. Асташкина О.В. Получение модифицированных химических волокон-аффинных сорбентов для вирусологии - Л., 1991, с.150. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Обзор литературных данных, Биотехнология, N 4, 1992, с.5 - 14.

(98) Адрес для переписки:
117813, Москва, ГСП-1 ул.Вавилова, 28, ИНЗОО
РАН, патентный отдел

(71) Заявитель:
Институт элементоорганических соединений
им.А.Н.Несмеянова РАН

(72) Изобретатель: Лозинский В.И.,
Плиева Ф.М., Исаева Е.И., Зубов А.Л.

(73) Патентообладатель:
Институт элементоорганических соединений
им.А.Н.Несмеянова РАН

(54) СПОСОБ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСА

(57) Резюме:

Изобретение относится к прикладной вирусологии, конкретно к процессам выделения, очистки, модификации вирусов и вирусных препаратов, т.е. к процессам, связанным с концентрированием вирусов. При концентрировании вируса путем его связывания биоаффинным сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывки и последующей десорбции, в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента используют криогель поливинилового спирта с размером пор 0,04 -

2,0 мкм. Кроме того, биоаффинный сорбент может, согласно данному изобретению, содержать наряду с антителами иммобилизованные ферменты. Предлагаемый способ обладает преимуществами по сравнению с аналогами и прототипом; а) повышена эффективность способа; б) повышена универсальность. Изобретение может быть использовано как в научных исследованиях, так и при производстве вакцин и диагностических, а также в медицинской практике. 1 з.п. ф-лы.

RU 2 130 069 C1

RU 2 130 069 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 130 069** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 7/00, 7/02, 11/02, A**
61 K 39/44

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97103958/13, 14.03.1997

(46) Date of publication: 10.05.1999

(38) Mail address:
117813, Moskva, GSP-1 ul.Vavilova, 28,
INEOS RAN, patentnyj otdel

(71) Applicant:
Institut ehlementoorganicheskikh soedinenij
im.A.N.Nesmejanova RAN

(72) Inventor: Lozinskij V.I.,
Plieva F.M., Isaeva E.I., Zubov A.L.

(73) Proprietor:
Institut ehlementoorganicheskikh soedinenij
im.A.N.Nesmejanova RAN

(54) **METHOD OF VIRUS CONCENTRATING**

(57) Abstract:
FIELD: applied virology. **SUBSTANCE:**
invention relates to methods of isolation,
purification and modification of viruses and
viral preparations i. e. to processes
associated with virus concentrating. Method
involves virus binding with bioaffinity
sorbent containing antibodies raised to
virus and immobilized on polymer base,
washing out and desorption. Polymer base of
bioaffinity sorbent is cryogel of polyvinyl
alcohol (pore size is 0.04-2.0 mcm). Also,

bioaffinity sorbent can contain both
immobilized enzymes modifying virus and
antibodies. Proposed method shows the
following advantages as compared with
analogues and prototype: a) enhanced
effectiveness of method; b) increased
universality. Invention can be used both in
scientific investigations and in production
of vaccines and diagnostics and in medicine
practice also. **EFFECT:** improved method of
virus concentrating. 2 cl, 7 ex

RU 2 130 069 C1

RU 2 130 069 C1

Изобретение относится к прикладной вирусологии, конкретно к процессам выделения, очистки, идентификации, модификации вирусом и вирусных препаратов, т. е. к процессам, связанным с концентрированием вирусом. Изобретение может быть использовано как в научных исследованиях, так и при производстве вакцин и диагностикомов, а также в медицинской практике.

Известными методами концентрирования вирусных частиц в современной вирусологии являются многоступенчатые операции длительного высокоскоростного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или глицерина, а также зонного электрофореза и др. [1], кроме того используется концентрирование вирусом с помощью биоаффинных сорбентов, содержащих иммобилизованные антитела к вирусу [2]. Последний подход характеризуется большей эффективностью и технологическими удобствами.

Так, известен способ биоаффинной очистки вируса кори, где используют носитель, содержащий иммуноглобулины сыворотки крови обезьян, ковалентно пришитые к поверхности модифицированных стеклянных бунсов [3]. Способ включает пропускание вирусосодержащей жидкости через хроматографическую колонку, заполненную биоаффинным сорбентом с иммуноглобулинами, ковалентно-пришитыми к стеклянному носителю, с последующей промывкой колонки 0,14M раствором NaCl и элюированием вируса 0,1M глициновым буфером при pH 2,3.

Недостатками такого способа являются низкая биоспецифическая емкость используемого носителя (работает только поверхность стеклянных гранул), неспецифическая адсорбция стеклом посторонних примесей и хрупкость, характерные для стеклянных носителей вообще.

Известен способ биоаффинной очистки вирусом разных размеров, где для очистки вирусом используется силикагель с контролируемыми размерами пор (0,05 - 1,0 мкм) с пришитыми аффинными лигандами [4]. Способ состоит из аналогичных операций хроматографической очистки целевого продукта, что и в предыдущем случае, только для промывания используют 0,1M Na-фосфатный буфер (pH 7,0), а для элюирования применяют 0,05M Na-цитратный буфер (pH 3,0).

Недостатками этого способа являются сложность получения иммуносорбента, связанная с многостадийной схемой модификации неорганического носителя, а также характерная для таких материалов хрупкость. Кроме того, в рабочих жидкостях даже со слабощелочной реакцией среды (pH 7,5-8,5) кремнеземные матрицы гидролитически нестабильны, что приводит к растворению активной поверхности и прогрессирующему снижению биоспецифической емкости.

Наиболее близким к предлагаемому по технической сущности является выбранный в качестве прототипа способ очистки вирусом сумчатой болезни цыплят путем его сорбционного концентрирования при пропускании вирусосодержащих суспензий

через колонку с иммуносорбентом, представляющим собой нерастворимый носитель - гранулированный азаронный гель (коммерческое название - сепароза-4Б), к которому после активации бромидом ковалентно пришиты иммуноглобулины [5]. Такой биоаффинный сорбент используют для очистки не очень крупных вирусом, размеры которых ее превышают 0,08 мкм.

Однако указанный способ концентрирования вирусом малоэффективен при работе с крупными (0,1-0,5 мкм) вирусом. Кроме того, гранулированные азаронные гели, в частности сепароза, имеют высокую стоимость и поэтому не могут найти крупномасштабного применения. Бромидан, используемый для активации данного носителя является высокотоксичным соединением, работа с ним представляет опасность для персонала.

Задача предлагаемого изобретения - разработка эффективного, универсального и технологически упрощенного способа концентрирования различных вирусом, в том числе и самых крупных вирусом с размером частиц до 0,5 мкм.

Решение этой задачи достигается тем, что при концентрировании вирусом путем его связывания биоаффинным сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывку и последующую десорбцию, в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента используют криогель поливинилового спирта с размером пор 0,04 - 2,0 мкм. Кроме того, биоаффинный сорбент может, согласно данному изобретению, содержать, наряду с антителами, иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус.

Сказавшись, что выбор криогеля поливинилового спирта (ПВС) в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента обеспечивает возможность технологического упрощения способа концентрирования вирусом, повышение эффективности способа в целом, его универсальности, в том числе и в отношении самых крупных вирусом с размером частиц до 0,5 мкм.

Весьма важными свойствами криогелей ПВС являются их биосовместимость, отсутствие токсичности, а также его доступностью и относительная дешевизна. Криогели ПВС образуются в результате замораживания концентрированных водных растворов ПВС, их выдерживания в замороженном состоянии в течение определенного времени и последующего оттаивания [6]. Сформированный таким образом макропористый криогель устойчив при температурах до 60-65°C и имеет температуру плавления 80-100 °C. Он обладает выраженной макропористостью [6], т. е. отвечает одному из основных требований, предъявляемых к носителям, предназначенным для работы с вирусом. Согласно предлагаемому изобретению в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента предусматривается использование криогеля ПВС, имеющего поры размером 0,05-2,0 мкм. Такие поры обеспечивают свободное проникновение даже самых крупных вирусом внутри гранул носителя, т. е. в связывании с вирусом участвуют аффинные лиганды всего объема носителя.

Кроме того, в противоположность хрупким макропористым неорганическим матрицам (макропористые стекла, кремнеземы, диатомит и др.) криогели ПВС являются хрупкими вакуумными физическими телами, мало подверженными абразивному износу даже при интенсивном перемешивании. Таким образом, криогели ПВС наряду с макропористостью удовлетворяют и требованию операционной стабильности. И, наконец, криогели ПВС могут, в случае необходимости, подвергаться стерилизации, например, промывке дезинфицирующими растворами, облучению или (для уничтожения отработанного материала) автоклавированию.

Способ осуществляют следующим образом: вирусосодержащую жидкость инкубируют с биоаффинным сорбентом, содержащим специфические антитела, иммобилизованные на активированной матрице криогеля ПВС, отмыкают несвязавшиеся посторонние компоненты и освобождают адсорбированный вирус из комплекса с биоаффинным сорбентом. Для модификации вируса используют биоаффинный сорбент, содержащий иммобилизованные специфические антитела и фермент (ферменты), способные вызвать модификацию вирусных частиц. Конкретная реализация предлагаемого изобретения иллюстрируется следующими примерами:

Пример 1.
Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H1N1, размер вирусных частиц 0,1 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 1,0 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,7 - 1,2 мг/г). Навеску (0,5 г) биоаффинного сорбента перемешивают с 2,0 мл вирусосодержащей жидкостью в течение 20 часов при +5°C, затем промывают несвязавшиеся компоненты 0,1M PBS (контроль - нулевые значения оптической плотности при 260 нм и 280 нм, а также отрицательная реакция гематоглицинации (РГА)), и далее проводят десорбцию вируса 0,65 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов до полного удаления вируса. Емкость биоаффинного сорбента по десорбированному антигену - 1400 ГАЕ/г носителя. (ГАЕ - произведение обратного титра на объем пробы). Специфичность полученного биоаффинного сорбента (с иммобилизованными антителами к вирусу гриппа А, H1N1) проверяют с помощью вируса гриппа А, H3N2. Антигенную активность определяют по реакции прямой гематоглицинации (РГА). Полученные результаты показывают, что на данном иммуносорбенте неспецифические антигены (H3N2) не сорбируются, т.е. наблюдается только биоспецифическая сорбция (концентрирование) антигенов.

Пример 2.

Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H1N1, размер вирусных частиц 0,1 мкм)

используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 0,5 мкм, активированный апилопоргидрином при pH 13, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,5 - 0,6 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса осуществляют в колоночном режиме с использованием 2,5M MgCl₂ в 0,05M трис-HCl (pH 7,4). Количество десорбированного вируса составляет 800 ГАЕ/г носителя.

Пример 3.

Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H3N2, размер вирусных частиц 0,12 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 0,7 мкм, активированный бромидом при pH 11,5, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 1,5 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,65 M NaCl в 0,5M трис-HCl (pH 7,4). Количество десорбированного вируса составляет 2000 ГАЕ/г носителя.

Пример 4.

Для концентрирования вируса парариппа ГГв (размер вирусных частиц 0,15 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 1,5 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 0,5, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови морских свинок, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,5 - 0,7 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,65 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4). Титр очищенного антигена (вируса парариппа ГГв) определяют методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Емкость биоаффинного сорбента в отношении данного вируса составляет 1266 единиц антигенной активности на 1 г носителя.

Пример 5.

Для концентрирования вируса оспы (размер вирусных частиц 0,4 x 0,2 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПАБ с максимальным диаметром пор до 2 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,2, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,8 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,75 NaCl в 0,05 трис-HCl (pH 7,8). Титр очищенного антигена (вируса оспы) определяют в непрямом варианте ИФА. Емкость биоаффинного сорбента в отношении данного вируса

составляет 2048 единиц антигенной активности на 1 г носителя.

Пример 6.

Для концентрирования и ферментативной модификации вируса ящура (размер вирусных частиц - 0,02 мкм) навеску (0,5 г) биоэффинного сорбента, представляющего собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор до 0,04 мкм, активированный глutarовым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела к вирусу ящура (получены из сыворотки крови телят, иммунизированных соответствующим антигеном) и модифицирующий фермент - палин (емкость сорбента по иммобилизованным антителам - 0,4 мкг/г, по палину - 0,2 мкг/г) перемешивают с 2,0 мл вирусосоудержающей жидкости в течение 12 часов при +5°C. Аналогичным образом поступают с контрольным биоэффинным сорбентом, у которого иммобилизованный палин содержит блокированную тиольную группу активного центра. Далее проводят десорбцию вируса 0,5M NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов. Емкость контрольного биоэффинного сорбента по десорбированному вирусу составляет 780 БОЕ/г носителя (БОЕ - близкообразующие единицы), носителя с активным палином - 32 БОЕ/г носителя, т.е. в 24,3 раза меньше, что является результатом действия иммобилизованного протеазы на вирусы ящура, оконцентрированный в фазе биоэффинного сорбента за счет взаимодействия с иммобилизованными антителами (факт подробного концентрирования доказывают результаты экспериментов с контрольным биоэффинным сорбентом), что в итоге приводит к значительному снижению вирусной активности вируса.

Пример 7.

Для концентрирования и ферментативной модификации вируса паротита (размер вирусных частиц 0,14 мкм) навеску (0,5 г) биоэффинного сорбента, представляющего собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор до 1,4 мкм, активированный глutarовым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела к вирусу паротита (получены из сыворотки крови хомяков, иммунизированных соответствующим антигеном) и модифицирующие ферменты - нейраминидазу и рибонуклеазу (емкость сорбента по иммобилизованным антителам - 0,3 мкг/г, по нейраминидазе - 0,15 мкг/г, по РНК-азе 0,2 мкг/г), инкубируют с 2,0 мл вирусосоудержающей жидкости в течение 12 часов при +5°C. Аналогичным образом поступают с контрольным биоэффинным сорбентом, представляющим собой препарат, в котором иммобилизованы на носителе только антитела, специфические к вирусу паротита (емкость контрольного биоэффинного сорбента по антителам - 0,7 мкг/г носителя). Затем отмыают несвязавшиеся компоненты 0,1M PBS (контроль - нулевые значения оптической плотности при 280 и 260 нм) и далее проводят десорбцию вируса 0,5 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов. Емкость контрольного биоэффинного сорбента по десорбированному вирусу

составляет 650 ГАЕ/г носителя, для сорбента с модифицирующими ферментами вирусологической активности не зафиксировано, что связано с действием иммобилизованной нейраминидазы на белковый капсид вируса паротита и последующего воздействия РНК-азы на освобождающуюся из вириона рибонуклеиновую кислоту, результатом чего является отсутствие вирусной активности вируса.

Предлагаемый способ концентрирования вируса обладает следующими преимуществами по сравнению с аналогами и прототипом:

- 15 - повышена эффективность способа, т.к. в противоположном способу-аналогу в заявляемом способе применяется биоэффинный сорбент на основе вязкоупругого нехрупкого и гидролитически стабильного криогеля ПВС, поэтому
- 20 - появляется возможность проводить концентрирование вируса не только в хроматографическом (колонном) варианте, но и в реакторах с перемешиванием сорбента, что существенно интенсифицирует массообменные процессы, т.е. улучшается технологичность способа;
- 25 - повышена универсальность способа, т.к. обеспечивается возможность концентрирования, наряду с мелкими, даже самых крупных вирусов (0,5 мкм и более), в то время как в способе-прототипе матрица биоэффинного носителя способна обеспечить диффузию внутрь его гранул лишь довольно мелких (до 0,08 мкм) вирусов, кроме того, универсальность заявляемого способа также обусловлена возможностью одновременного
- 30 концентрирования и ферментативной модификации вируса, когда биоэффинный сорбент наряду с иммобилизованными антителами содержит иммобилизованный модифицирующий фермент (ферменты);
- 35 - биоэффинные сорбенты на основе криогеля ПВС инертны и высокоспецифичны, их можно повторно применять без существенной специфической активности, полимер, используемый для приготовления гелевой основы дешев и доступен.

Литература

- 45 1. Х. Френель-Конрат. Химия и биология вирусов // М., 1972, стр. 33-37.
- 2. Я. Туркова. Аффинная хроматография // М., 1980, стр. 5-14.
- 3. Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: a comparative study // Njayou M., Quash G // J. Virol. Meth. - 1991, v. 32, N 1, p167-77.
- 4. Separation and purification of biopolymers by affinity chromatography on controlled-pore silica gel // Colpan M // Ger. Offen. DE 3627063, cl. B 01 D 15/08, 1988.
- 5. Separation and purification of antigen for diagnosis of infectious bursa disease in chickens. Nagai Sh., Okaki Y., Ueda S., JP 63210775, cl. G 01 N 33/569, 1989.
- 6. Применение криогель поливинилового спирта в биотехнологии. Обзор литературных данных. // Позинский В.И., Вакула А.В., Зубов А.Л. // Биотехнология, N 4, 1992, с. 5-14.

Формула изобретения:

- 1. Способ концентрирования вируса, включающий его связывание биоэффинным

RU 2 1 3 0 0 6 9 C 1

сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывку и последующую десорбцию, отличающийся тем, что в качестве полимерной основы бисаффинового сорбента используют криогель поливинилового спирта

с размером пор 0,04 - 2,0 мкм.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что связывание вируса осуществляют с помощью бисаффинового сорбента, содержащего, наряду с антителами, иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2 1 3 0 0 6 9 C 1